Biologische Charakterisierung der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenoviren; Einfluß des Alters von Hühnerfibroblasten-Kulturen und Hühnerembryonen auf die beiden Aktivitäten

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Jeng Hoei, Kho

Saarbrücken

1973

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. ZIMMERMANN

Biologische Charakterisierung der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenoviren; Einfluß des Alters von Hühnerfibroblasten-Kulturen und Hühnerembryonen auf die beiden Aktivitäten

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Jeng Hoei, Kho
geb. am 20.6.1940 in Pekalongan, Indonesien

Dekan: Prof. Dr. med. H. KULENKAMPFF
Referent: Prof. Dr. med. R. WIGAND

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 20.12.1972 abgelegt.

Inhaltsübersicht

I. Einleitung 1

II. Fragestellung 4

III. Material und Methoden 5

1. Viren
2. Zellkulturen
3. Lösungen
4. Interferonherstellung
5. Bestimmung des Interferontiters
6. Interferenztiter-Bestimmung
7. Titration des Interferoninduktors
8. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in verschiedenen Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen
9. VSV-Vermehrung in verschiedenen HF-Kulturen
10. Infektionstiter(CPE_{50})-Bestimmung

IV. Ergebnisse 12

1. Einfluß des Alters von HF-Kulturen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus 9-15
   a. Aktivität der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus 9-15 in Hühnerfibroblasten-Kulturen verschiedenen Alters
   b. Quantität der Interferonbildung in HF-Kulturen von verschiedenem Alter
   c. Antivirale Aktivität des Interferons in HF-Kulturen verschiedenen Alters
   d. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in HF-Kulturen von verschiedenem Alter
   e. VSV-Vermehrung in Hühnerfibroblasten-Kulturen von verschiedenem Alter

2. Einfluß des Alters der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus 9-15 18

a. Aktivität der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus Typ 9-15 in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

b. Interferonbildung in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

c. Antivirale Wirkung des Interferons in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

d. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

e. VSV-Vermehrung in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

V. Diskussion 25

VI. Zusammenfassung 30

VII. Schrifttumsverzeichnis 31

EINLEITUNG

Die von Adenoviren induzierte Interferenz und Interferonbildung in Hühnerzellkulturen wurde von einigen Autoren untersucht (Ho und Köhler, 1967; Béládi und Pusztai, 1967; Béládi et al., 1970; Guenov, 1970). Pusztai et al. (1969) haben festgestellt, daß die induzierte Interferonmenge von der Infektionsdosis des Adenovirus abhängig ist. Markovitz (1970) hat bei höheren Virusdosen sowohl Interferenz als auch Interferon nachgewiesen, während bei niedrigen Virusdosen nur Interferenz nachweisbar war. Béládi und Pusztai (1967) haben gezeigt, daß die interferoninduzierende Eigenschaft von Adenoviren empfindlich gegenüber Hitze und Trypsin ist.

Bei der Interferonbildung und bei der antiviralen Aktivität des Interferons spielt neben anderen Faktoren auch das Alter der Zellkulturen eine Rolle. Ho und Enders (1959) beobachteten, daß menschliche Amnionzellen, die für zwei Wochen oder länger kultiviert wurden, nach einer Beimpfung mit Typ 2 von Poliovirus mehr Interferon produzierten als die jüngeren Zellen. Im Gegensatz dazu fanden Johnson und McLaren (1965) keine Korrelation zwischen der Interferonbildung und dem Alter der menschlichen Amnionzellen nach der Beimpfung mit demselben Virus. Carver und Marcus (1967) berichteten, daß die älteren Hühnerzellen nach der Infektion mit Sindbis-Virus mehr Interferon gebildet haben als die jüngeren Zellen und daß sie außerdem empfindlicher gegenüber der antiviralen Wirkung des Inter-

ferons waren. Kato und Eggers (1969) beschrieben, daß in 3 Tage alten Hühnerzellen nach einer Beimpfung mit ultraviolet-inaktiviertem Newcastle Disease Virus (NDV) mehr Interferon gebildet wurde als in 1 Tage alten Zellen. Ein deutlicher Unterschied der antiviralen Aktivität von Interferon in Hühnerzellen verschiedenen Alters wurde nicht beobachtet.

Das Alter der zur Kultur verarbeiteten Hühnerembryonen spielt ebenfalls eine Rolle bei der Interferonbildung und bei der antiviralen Aktivität des Interferons. Isaacs und Baron (1960)haben beobachtet, daß die Chorioallantoismembranen von jüngeren Hühnerembryonen nach der Infektion mit ultraviolet-inaktiviertem Influenzavirus weniger Interferon produzierte als die von älteren; zu den war die letztere empfindlicher gegenüber der antiviralen Wirkung von Interferon. Morahan und Grossberg (1970) beobachteten, daß in einem älteren Hühnerembryo nach der Infektion mit neurotropem WS-Influenzavirus mehr Interferon gebildet wurde als in einem jüngeren; dies war jedoch nach NDV-Infektion nicht der Fall. Die antivirale Aktivität von Interferon in Zellen von 13 Tage alten Hühnerembryonen war signifikant höher als in Zellen von 6-tägigen Hühnerembryonen.

Die Strukturen von Adenoviren und die serologischen Eigenschaften der Adenoviren wurden in einer Reihe von Veröffentlichungen eingehend untersucht (Brenner et al., 1959; Valentine und Pereira, 1965; Wigand, 1968; Wigand

und Fliedner, 1968). Das Adenovirus vom Typ 9-15 wurde von Cramblett et al. (1960) beschrieben und von Wigand (1965) näher charakterisiert. Es besitzt serologische Eigenschaften, die zwischen Typ 9 und Typ 15 liegen. Es läßt sich durch Immumserum vom Typ 15 neutralisieren, im Hämagglutinationstest dagegen läßt es sich durch Immumserum vom Typ 9 hemmen. Shu und Budiman (1970) berichteten, daß dieser Typ hohe interferierende und interferoninduzierende Aktivität aufweist.

Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte folgendes untersucht werden:

1. Einfluß des Alters von Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15.

2. Einfluß des Alters der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15.

Für beide Teilprobleme sind im einzelnen die folgenden Fragen relevant, wobei jedes Mal sowohl der Einfluß des Alters von Kulturen wie auch derjenige des Alters von Hühnerembryonen zu untersuchen waren:

a. Die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 in HF-Kulturen.

b. Quantität der Interferonbildung in HF-Kulturen.

c. Empfindlichkeit der HF-Kulturen gegenüber der antiviralen Wirkung von Interferon.

d. Empfindlichkeit der HF-Kulturen gegenüber der Infektiosität des Vesiculären Stomatitis-Virus (VSV-Titer).

e. Vermehrung von VSV in HF-Kulturen (VSV-Ausbeute).

MATERIAL und METHODEN

1. Viren

Virusarten: Adenovirus Typ 9-15 (Stamm 5399)
Vesiculäres Stomatitis-Virus (VSV) (Stamm Indiana)

Virusherstellung:

Adenovirus Typ 9-15 Impfvirus: Adenovirus 9-15 wurde in dreitägiger HeLa- bzw. KB-Zellkultur in einer Penicillinflasche bei 37°C gezüchtet. Die Virusdosis wurde so gewählt, daß sich nach etwa 2 bis 3 Tagen ein maximaler cytopathogener Effekt (CPE) zeigt. Die Ernte erfolgte durch Einfrieren der ganzen Flasche am Tag des maximalen CPE. Nach zweimaligem Einfrieren und Auftauen wurde das Virus durch Zentrifugieren vom Zelldetritus getrennt. Der Überstand war das Impfvirus.

Vesiculäres Stomatitis-Virus: VSV wurde in Hühnerfibroblasten-Kulturen in Roux-Flaschen gezüchtet. Am Tag des maximalen CPE wurde die Kultur-Flüssigkeit geerntet und 10 Minuten lang bei 3000 rpm. zentrifugiert. Der Überstand war das VSV.

2. Zellkulturen

Zellkulturarten: HeLa- und KB-Zellkultur
Hühnerfibroblasten-Kultur

Zellkulturherstellung:

HeLa- und KB-Zellkultur: HeLa- und KB-Zellen wurden in Eagle'schem Minimalmedium mit 5% inaktiviertem Kälberserum in Roux-Flaschen bei 37°C gezüchtet. Zur Herstellung von HeLa- oder KB-Zellkulturröhrchen wurde das Medium der mit Zellen bewachsenen Roux-Flasche steril abgegossen. Danach setzte man den Zellrasen für etwa 1 bis 2 Minuten einer 0,25%igen Trypsinlösung an, wobei der Zellrasen gerade eben von der Lösung bedeckt sein soll. Nach Abgießen der Trypsinlösung läßt man die Flasche etwa 10 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank, bis die Zellen sich von der Flaschenwand abgelöst haben. Mit etwa 10 ml Eagle'schem Minimalmedium wurden die aufgeschwemmten und abgelösten Zellen in ein steriles Gefäß gegeben und dann mit etwa 150 ml Eagle'schem Minimalmedium mit 5% Kälberserum verdünnt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde mit einer automatischen Spritze in je ein steriles Röhrchen eingefüllt und bei 37°C im Brutschrank für 2-3 Tage bebrütet.

Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen: Bei einem bebrüteten Hühnerei wurde über einer Lampe die Luftblase mit Bleistift markiert. Die Eischale wurde mit Alkohol desinfiziert und danach mit einer Hautschere dem Bleistiftstrich entlang abgeschnitten. Die Eihaut wurde mit einer sterilen Pinzette entfernt, der Embryo entnommen und in eine Petrischale gegeben. Die Augen wurden entfernt. Der Embryo wurde so fein wie möglich zerkleinert. Der Gewebsbrei wurde in Erlenmeyer Kölbchen zweimal mit Hankscher Lösung gewaschen und mit 0,25%iger Trypsinlösung von 37°C überschichtet. Nach 60 bis 120 Minuten Bebrütung bei 37°C wurde die Trypsinlösung abgegossen. Das Gewebssediment wurde im gleichen Kölbchen 2 bis 3 mal in Wachstumsmedium ausgeschüttelt und durch Gaze filtriert. Zur Zellsuspension wurde noch so viel Wachstumsmedium hinzugefügt, bis die Zellzahl $3 \cdot 10^5$ beträgt. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in je ein steriles Röhrchen bzw. je 15 ml in je eine Vierkantflasche oder je 100 ml in je einer grossen Roux-Flasche eingefüllt und bei 37°C im Brutschrank für 2 bis 3 Tage bebrütet.

3. Lösungen

Nährlösungen: Eagle'sches Minimalmedium diente als Erhaltungsmedium. Als Wachstumsmedium wurde Eagle'sches Minimalmedium mit Zusatz von 10% inaktiviertem Kälberserum verwendet.

Trypsinlösung: Trypsin-Difco 1:250, 0,25% in Phosphatpufferlösung pH 7,4

Hanks-Lösung.

4. Interferonherstellung

Einschichtige Hühnerfibroblasten-Kulturen, hergestellt von einem 10 Tage alten Embryo, wurden in Vierkantflaschen mit je 7 CPE_{50} Adenovirus Typ 9-15 (siehe Abschnitt 10) in 10 ml Erhaltungsmedium beimpft. Nach 3 Tagen bei 37°C wurde die Kulturflüssigkeit geerntet und bei 3000 rpm. 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Inaktivierung von restlichem Virus in einem Wasserbad von 56°C 1 Stunde lang erhitzt und als Interferon verwendet.

5. Bestimmung des Interferontiters:

Diese Methode beruht auf der Bestimmung der antiviralen Aktivität des Interferons. Die hitzeinaktivierte Kulturflüssigkeit wurde in Eagle'schem Minimalmedium stufenweise mit dem Faktor 2 verdünnt und in Volumina von je 1 ml in je zwei HF-Röhrchen gegeben. Nach 24 Stunden bei 37°C wurde die Kulturflüssigkeit abgegossen und die HF-Röhrchen mit VSV (1000 $TCID_{50}$) infiziert. Als Interferontiter wurde die höchste Verdünnungsstufe der Kulturflüssigkeit bezeichnet, die nach 48 Stunden noch 50% des cytopathogenen Effekt von VSV hemmen konnte.

6. Interferenztiter-Bestimmung

Adenovirus 9-15 wurde nach einer Vorverdünnung stufenweise mit dem Faktor 2 in Eagle'schem Minimalmedium verdünnt und in Volumina von je 1 ml in je zwei HF-Röhrchen verimpft. Nach 24 Stunden bei 37°C wurde die Kulturflüssigkeit entfernt und die HF-Röhrchen mit VSV (1000 $TCID_{50}$) infiziert. Es muß darauf geachtet werden, daß das pH der Kultur während der ganzen Versuchszeit zwischen 6,8 und 7,6 bleibt. Die Verdünnungsreihen von VSV und Adenovirus 9-15 wurden mindestens eine Woche vor dem Versuch in grösserem Volumen hergestellt und in mehreren Portionen bei -20°C bzw. bei -70°C eingefroren. Eine Verdünnungsreihe wurde für jeden Versuch aufgetaut und sofort auf die HF-Röhrchen verschiedenen Alters beimpft. Auf diese Weise wurden Pipettierfehler vermieden. Als Interferenztiter wird diejenige Virusverdünnung bezeichnet, welche nach 48 Stunden noch 50% des VSV CPE hemmt.

7. Titration des Interferoninduktors

Diese Methode beruht auf dem qualitativen Nachweis von Interferon in dem mit Virusverdünnung infizierten Zellkulturröhrchen. Adenovirus 9-15 wurde nach unter Abschnitt 6 angegebener Weise verdünnt und in die HF-Röhrchen verimpft. Nach 24 Stunden wurden die Überstände von jeder Verdünnung gesammelt und das Virus hitzeinaktiviert. Die Kulturflüssigkeit wurde danach in Volu-

mina von 1 ml in je zwei HF-Röhrchen gegeben, die von einem 10 Tage alten Hühnerembryo hergestellt wurden. Nach 24 Stunden bei 37°C wurde die Kulturflüssigkeit abgegossen und die HF-Röhrchen mit VSV (1000 $TCID_{50}$) infiziert. Als Interferoninduktortiter wird die höchste Virusverdünnungsstufe bezeichnet, die nach 48 Stunden bei 37°C noch 50% des VSV CPE hemmen kann.

8. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in verschiedenen Hühnerfibroblasten-Kulturen

VSV wurde mit Eagle'schem Minimalmedium auf 100 $TCID_{50}$ vorverdünnt und dann stufenweise mit Faktor 2 weiterverdünnt. In Volumina von je 1 ml wurde das verdünnte VSV auf Grppen von je zwei HF-Röhrchen verschiedenen Alters bzw. auf Gruppen von je zwei HF-Röhrchen von Embryonen verschiedenen Alters verimpft. Die Verdünnungsreihen von VSV mit dem Faktor 2 wurden mindestens eine Woche vor dem Versuch in grösserem Volumen hergestellt und in mehreren Portionen bei -70°C eingefroren, wobei eine Verdünnungsreihe für jeden Versuch aufgetaut wurde und sofort auf die HF-Röhrchen verschiedenen Alters beimpft. Als VSV-Titer wurde die höchste VSV-Verdünnungsstufe bezeichnet, in welcher nach 3 Tagen bei 37°C 50% der verimpften HF-Röhrchen CPE zeigt.

9. VSV-Vermehrung in verschiedenen HF-Kulturen

VSV wurde mit Eagle'schem Minimalmedium auf 100 $TCID_{50}$ verdünnt und in Volumina von je 1 ml auf Gruppen von je zwei HF-Röhrchen verschiedenen Alters bzw. auf Gruppen von je zwei HF-Röhrchen von Embryonen verschiedenen Alters beimpft. Nach 2 Tagen bei 37°C wurden die Virusprobengeerntet und auf ihren Virusgehalt titriert. Die Berechnung der $TCID_{50}$ erfolgte nach der Methode von Reed und Muench (1938).

10. Infektionstiter-Bestimmung

Die Bestimmung der Infektiosität von Adenovirus 9-15 nahmen wir durch Verimpfung von 0,2 ml Virusverdünnungsreihen mit dem Faktor 2 bzw. 4 in HeLa-Kulturröhrchen vor. Die Beobachtungszeit betrug 3 Tage. Als CPE_{50} wird diejenige Virusverdünnungsstufe bezeichnet, in welcher 50% der Zellen einen cytopathogenen Effekt zeigten.

ERGEBNISSE

1. Einfluß des Alters von Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15

a. Aktivität der interferierende und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus 9-15 in Hühnerfibroblasten-Kulturen verschiedenen Alters

Um die interferierende und die interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus 9-15 in Hühnerfibroblasten-Kulturen verschiedenen Alters miteinander zu vergleichen, wurden der Interferenztiter und der Interferoninduktortiter in einschichtige HF-Kulturen von einem 6 Tage alten Embryo 2, 4, 6 und 8 Tage nach Anlegen der Kultur getestet.

Wie Abb. 1 zeigt, hängt die Entfaltung der interferierenden und interferoninduzierenden Aktivität des Adenovirus 9-15 von dem Alter der HF-Kultur ab. Je älter die HF-Kultur ist, desto höher sind die Titer der beiden Aktivitäten. Besonders ausgeprägt ist der Anstieg von 2 bis 4 Tage alten HF-Kulturen. Die beiden Virusaktivitäten verliefen offensichtlich weitgehend parallel zueinander.

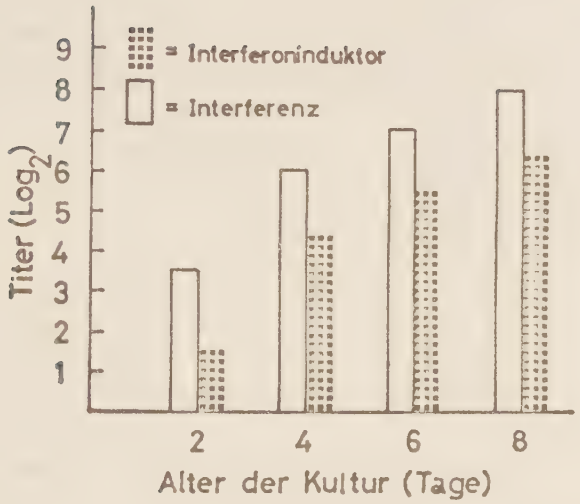

Abb.1 Aktivität der interferierenden und der interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus 9-15 in 2, 4, 6 und 8 Tage alten HF-Kulturen

b. Quantität der Interferonbildung in HF-Kulturen von verschiedenem Alter

Zum Nachweis etwaiger Unterschiede in der Interferonbildung in HF-Kulturen verschiedenen Alters, wurden 2 bis 8 Tage alte HF-Kulturen in Vierkantflaschen mit Adenovirus 9-15 (7 CPE_{50}/10 ml) beimpft. Nach 3 Tagen bei 37°C wurde die Kulturflüssigkeit geerntet, zentrifugiert und das restliche Virus im Überstand hitzeinaktivviert. Ihr Interferongehalt wurde dann titriert.

Abb.2 Interferonbildung in 2, 4, 6 und 8 Tage alten HF-Kulturen

Aus Abb.2 geht hervor, daß in der älteren Hühnerfibroblastenkultur mehr Interferon gebildet wurde als in der jüngeren. Die Interferonbildung ist in 8 Tage alten HF-Kulturen etwa 4-fach höher als in HF-Kulturen von 2 Tagen.

c. Antivirale Aktivität des Interferons in HF-Kulturen verschiedenen Alters

Ein Teil unserer Untersuchung erstreckte sich darauf, festzustellen, ob unter unseren Arbeitsbedingungen eine unterschiedliche Empfindlichkeit der HF-Kulturen verschiedenen Alters gegenüber der Interfe-

ronwirkung festzustellen ist.

Die Interferon-Verdünnungsreihe wurde eine Woche vor dem Versuch hergestellt und bei 4°C aufgehoben. Diese Verdünnungsreihe wurde für die Bestimmung des Interferontiters in 2 bis 8 Tage alten HF-Kulturen verwendet.

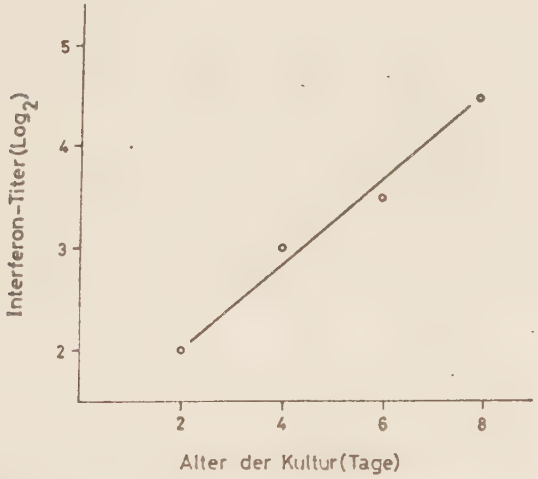

Abb.3 Empfindlichkeit der 2 bis 8 Tage alten HF-Kulturen gegenüber der antiviralen Wirkung des Interferons.

Aus Abb.3 ist zu entnehmen, daß die ältere HF-Kultur der antiviralen Wirkung des Interferons gegenüber empfindlicher ist als die jüngere. Je älter die Kultur ist, desto höher ist auch der Interferontiter. Im Vergleich zu der 2 Tage alten Kultur ist der Interferontiter der 8 Tage alten Kultur um das 6-fache erhöht.

d. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in HF-Kulturen von verschiedenem Alter

Um festzustellen, ob die HF-Kulturen verschiedenen Alters eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Infektiosität des VSV zeigen, wurden die VSV-Titer in 2 bis 8 Tage alten HF-Röhrchen getestet.

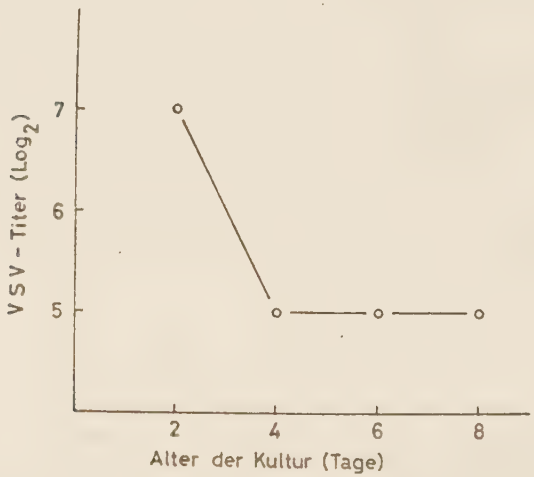

Abb.4 VSV-Titer in 2, 4, 6 und 8 Tage alten HF-Kulturen

Wie Abb.4 zeigt, ist der VSV-Titer in einer 2 Tage alten HF-Kultur 4-fach höher als in einer 4 Tage alten. Zwischen 4 bis 8 Tage alten HF-Kulturen wurde keine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Infektiosität des VSV festgestellt.

e. VSV-Vermehrung in Hühnerfibroblasten-Kulturen von verschiedenem Alter

Zum Nachweis von Unterschieden in der VSV-Vermehrung in HF-Kulturen verschiedenen Alters wurden die Kulturröhrchen mit VSV (100 $TCID_{50}$/ml) infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Überstände geerntet und die VSV-Titer bestimmt.

Tabelle 1 VSV-Ausbeute von 2, 4, 6 und 8 Tage alter HF-Kultur

Alter der Kultur (Tage)	VSV-Ausbeute (VSV-Titer, log_{10}/ml)
2	7,34
4	7,24
6	7,16
8	7,19

Aus Tabelle 1 geht hervor, Daß die VSV-Ausbeute von 2 bis 8 Tage alten Kulturen fast gleich groß ist. Ob in der 2 Tage alten HF-Kultur mehr VSV gebildet wird als in den älteren Kulturen, ist aus diesen Versuchen nicht abzuleiten, da der Unterschied nicht deutlich ist.

2. Einfluß des Alters der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen auf die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus 9-15

a. Aktivität der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus Typ 9-15 in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

Zum Nachweis einer etwaigen Abhängigkeit der interferierenden und interferon induzierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 vom Alter der verwendeten Hühnerembryonen, wurden die Interferenztiter und die Interferoninduktortiter in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Hühnerembryonen getestet. Die HF-Kulturen werden 3 Tage nach Anlegen benutzt.

Wie Abb.5 zeigt, hängt die Entfaltung der Interferierenden und interferoninduzierenden Aktivität des Adenovirus Typ 9-15 von dem Alter der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen ab. Je älter der verwendete Embryo ist, desto höher sind die Titer der beiden Aktivitäten. Der Anstieg des Interferenztiters ist größer als der des Interferoninduktortiters.

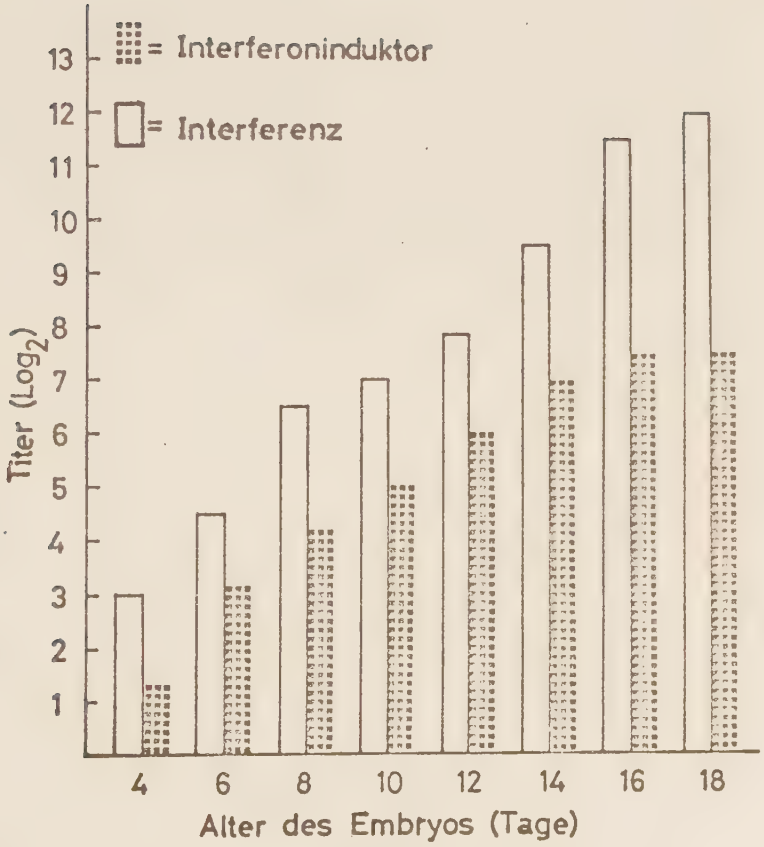

Abb.5 Aktivität der interferierenden und interferon-induzierenden Eigenschaft von Adenovirus 9-15 in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen

b. Interferonbildung in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

HF-Kulturen von 4 bis 14 Tage alten Embryonen wurden in Vierkantflaschen mit Adenovirus 9-15 (7 CPE_{50}/10 ml) beimpft. Nach 3 Tagen bei 37°C wurden die Kulturflüssigkeiten geerntet, zentrifugiert und das restliche Virus im Überstand hitzeinaktiviert. Ihr Interferongehalt wurde dann titriert.

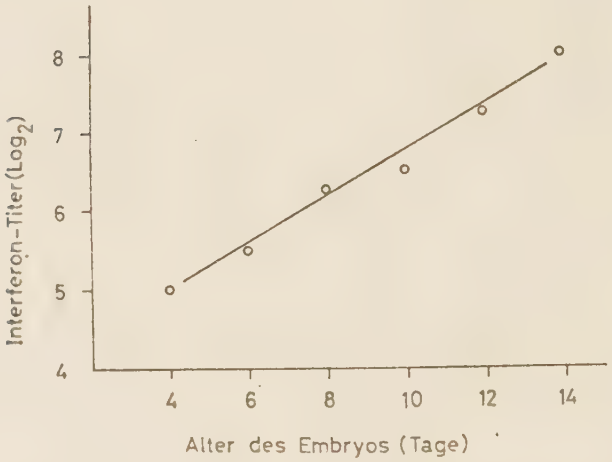

Abb.6 Interferonbildung in HF-Kulturen von 4 bis 14 Tage alten Embryonen

Aus der Abb.6 geht hervor, daß die Interferonbildung zwischen 4 bis 14 Tage alten Embryonen linear ansteigt. Die gebildete Interferonmenge ist in der HF-Kultur eines 14 Tage alten Embryos 8-fach höher als in der eines 4 Tage alten.

c. Antivirale Wirkung des Interferons in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

In dieser Untersuchung wurden die Empfindlichkeit der HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen gegenüber der antiviralen Wirkung eines Interferons miteinander verglichen. Das Interferon wurde in HF-Kultur eines 10-tägigen Embyos nach der Infektion mit Adenovirus Typ 9-15 hergestellt und in Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Hühnerembryonen titriert.

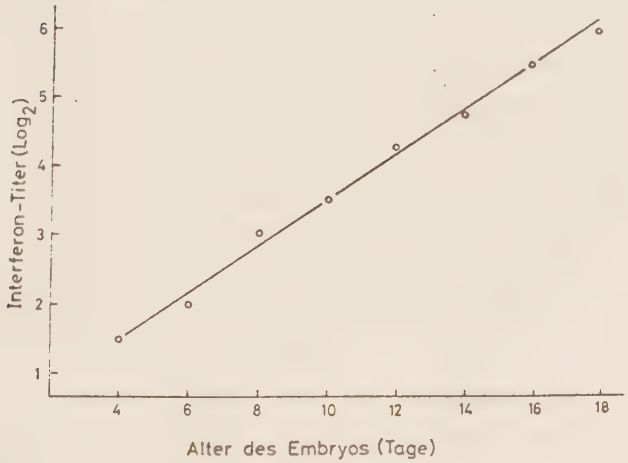

Abb.7 Empfindlichkeit der HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen gegenüber der antiviralen Wirkung des Interferons

Aus der Abb.7 ist zu entnehmen, daß HF-Kultur von älteren Embryonen der antiviralen Wirkung des Interfe-

rons gegenüber empfindlicher ist als die HF-Kultur von jüngeren. Der Interferontiter steigt mit dem Alter der verwendeten Embryonen linear an. Er ist in HF-Kultur eines 18-tägigen Hühnerembryos im Vergleich zur HF-Kultur eines 4-tägigen um das 24-fache erhöht.

d. Vergleichende Bestimmung des VSV-Titers in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

Der gleiche Vorrat von VSV wurde in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen titriert.

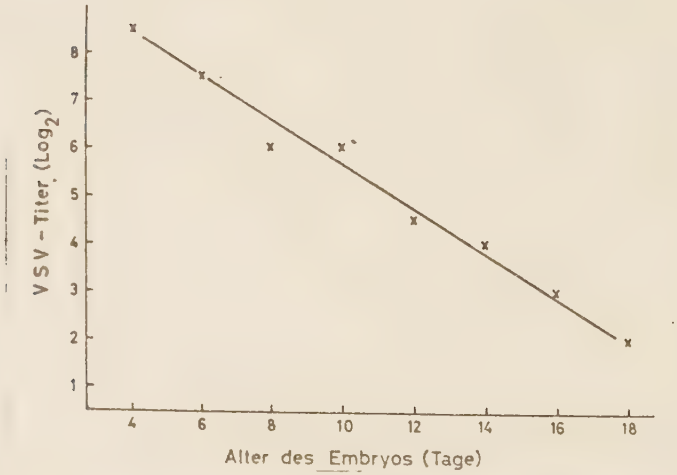

Abb.8 VSV-Titer in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen

Abb.8 zeigt, daß HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen gegenüber Infektiosität des VSV unterschiedlich empfindlich sind. Der VSV-Titer fällt mit

dem Alter der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen linear ab. Im Vergleich zur HF-Kultur von einem 18-tägigen Embryo ist der VSV-Titer in der HF-Kultur eines 4-tägigen Embryos etwa 100-fach höher.

e. VSV-Vermehrung in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters

Zum Nachweis quantitativer Unterschiede der VSV-Vermehrung in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen wurden die Kulturen mit VSV (100 $TCID_{50}$/ml) infiziert. Nach zwei Tagen bei 37°C wurden die Überstände geerntet und die VSV-Titer bestimmt.

Tabelle 2 VSV-Ausbeute aus HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryonen

Alter des Embryos (Tage)	VSV - Ausbeute (VSV-Titer, log_{10}/ml)
4	7,66
6	7,40
8	7,40
10	7,20
12	7,80
14	7,57
16	7,24
18	8,00

Aus Tab.2 geht hervor, daß die vermehrte VSV-Menge in HF-Kulturen von 4 bis 18 Tage alten Embryo-

nen zwischen $10^{7,2}$ und $10^{8,0}$ liegt. Ein deutlicher Unterschied der VSV-Vermehrung wurde nicht nachgewiesen.

D I S K U S S I O N

Aus unseren Befunden hat sich herausgestellt, daß in Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen von verschiedenem Alter die Aktivität der interferierenden und interferoninduzierenden Eigenschaft von Adenovirus Typ 9-15 mit dem Alter der Kultur ansteigt. Der größte Anstieg fand sich bei 4 Tage alten Kulturen im Vergleich zu 2 Tage alten. Eine unterschiedliche Aktivitätsentfaltung der beiden Virus-Eigenschaften wurde nicht beobachtet. Aus der Literatur geht zwar hervor, daß die Interferenzerscheinung im allgemeinen durch Interferon bedingt sei (Henle et al., 1959; Burke und Isaacs, 1960; Vilcek, 1960; Friedman, 1964;) und daß in älteren Hühnerzell-Kulturen mehr Interferon produziert wird als in jüngeren. (Henslová und Libíková, 1966; Carver und Marcus, 1967; Kato und Eggers, 1969). Nach unseren Ergebnissen steigt jedoch die Menge des gebildeten Interferons (Abb.2) in der älteren HF-Kultur etwa dreifach weniger an als die interferierende und interferoninduzierende Aktivität. (Abb.1). Daraus läßt sich schließen, daß nicht nur die gebildete Interferonmenge, sondern auch andere Faktoren für die Entfaltung der beiden Aktivitäten eine wesentliche Rolle spielen dürften.

Carver und Marcus (1967) haben festgestellt, daß 6 Tage alte Hühnerzellen der Interferonwirkung gegenüber empfindlicher sind als 2 Tage alte Zellen. Kato und Eggers

(1969) dagegen konnten einen derartigen Unterschied nicht nachweisen. Unter unseren Arbeitsbedingungen nimmt die antivirale Aktivität des Interferons mit dem Alter der Hühnerfibroblasten-Kulturen zu. Dies ist ein Hinweis dafür, daß auch die Empfindlichkeit der Kultur gegenüber der antiviralen Wirkung des Interferons den Titer der interferierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 beeinflussen kann.

Carver und Marcus (1967) haben berichtet, daß sich die VSV-Plaquezahl in den Hühnerzellkulturen mit zunehmendem Alter um das 2- bis 3-fache vermindert bei Verwendung von 1 bzw. 5 Tage alten Hühnerzellkulturen. Im Vergleich mit 2 Tage alten HF-Kulturen war bei uns der VSV-Titer in 4 Tage alten HF-Kulturen um das vierfache niedriger. Im Gegensatz zu dem Befund von Carver und Marcus (1967) wurde jedoch in noch älteren HF-Kulturen kein Titerabfall mehr festgestellt. Diese Feststellung dürfte auch die Frage beantworten, warum der größte Anstieg der interferierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 bei 2 bis 4 Tage alten HF-Kulturen liegt.

Im Ausmaß der VSV-Vermehrung in HF-Kulturen verschiedenen Alters wurde kein wesentlicher Unterschied festgestellt. Sie dürfte also hinsichtlich der interferierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 keine Rolle spielen.

In Hühnerfibroblasten-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters steigt die interferierende und interferoninduzierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 ebenfalls mit dem Alter der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerem-

bryonen an. Jedoch ist der Anstieg der interferierenden Aktivität des Virus größer als der der interferoninduzierenden Aktivität. (Abb.5) Morahan und Grossberg (1970) berichteten, daß die Resistenz des Hühnerembryos bzw. der Hühnerzellen gegenüber Myxoviren und VSV möglicherweise auf a) der Fähigkeit der Zelle zur Interferonbildung, b) der Interferon-Empfindlichkeit der Zelle, c) der Virusempfindlichkeit der Zelle beruht. Zur Klärung des Mechanismus der altersabhängigen interferierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters wurden weitere Untersuchungen dahingehend unternommen, in wieweit diese Faktoren die interferierende Aktivität des Virus beeinflussen.

Zu a.: So induziert Adenovirus 9-15 in einer HF-Kultur von älteren Embryonen mehr Interferon als in einer HF-Kultur von jüngeren. (Abb.6). Ähnliche Befunde wurden von Isaacs und Baron (1960) in Hühnerchorioallantoismembranen nach der Infektion mit ultraviolet-inaktiviertem Influenzavirus, und von Morahan und Grossberg (1970) in Hühnerembryonen nach der Infektion mit neurotropem WS-Influenzavirus erhoben. Im Vergleich mit der interferierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 (Abb.5) ist der Anstieg der Interferonbildung in den HF-Kulturen von älteren Embryonen niedriger. Offensichtlich ist die gebildete Interferonmenge nicht allein für den Anstieg der interferierenden Aktivität des Virus verantwortlich.

Zu b.: Cantell et al. (1967) berichteten, daß Hühner-

zellen von 15 Tage alten Embryonen gegenüber der antiviralen Wirkung des Interferons etwa 8 mal empfindlicher sind als die Zellen von 8 Tage alten. Auch Morahan und Grossberg (1970) stellten fest, daß die antivirale Aktivität von Interferon in Zellen von 13 Tage alten Hühnerembryonen signifikant höher ist als in Zellen von 6 Tage alten. Unter unseren Arbeitsbedingungen sind die Zellen von 18 Tage alten Embryonen etwa 24-fach empfindlicher als die von 4 Tage alten. Dieser Befund zeigt deutlich, daß auch die Empfindlichkeit der Hühnerzellen von Embryonen verschiedenen Alters der antiviralen Wirkung von Interferon gegenüber einen Einfluß auf den Titer der interferierenden Aktivität des Adenovirus 9-15 ausübt.

Zu c.: Morahan und Grossberg (1970) fanden, daß in Hühnerzellen von 6 Tage alten Embryonen 6 mal so viele Plaques von VSV gebildet werden als in Zellen von 13 Tage alten Embryonen. In Übereinstimmung damit ist der VSV-Titer nach unserer Methode in der HF-Kultur 4 Tage alter Embryonen etwa 100-fach höher als der in der HF-Kultur 18-tägiger Embryonen. Da die Interferenztitration in Kulturen von Hühnerembryonen verschiedenen Alters und die Interferoninduktortiter-Bestimmung in Kulturen 10-tägiger Embryonen durchgeführt wurden, hat die Empfindlichkeit der HF-Kulturen gegenüber der Infektiosität von VSV und der antiviralen Wirkung von Interferon nur Einfluß auf die interferierende Aktivität des Adenovirus Typ 9-15, nicht aber auf seine interferoninduzierende Aktivität.

Das erklärt wahrscheinlich die Tasache, daß der Anstieg der interferierenden Aktivität größer ist als der der interferoninduzierenden Aktivität.

Hinsichtlich der VSV-Vermehrung in HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters wurde kein wesentlicher Unterschied festgestellt. Sie dürfte also wahrscheinlich für die interferierende Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 keine Rolle spielen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Entfaltung der interferierenden und interferon-induzierenden Aktivität von Adenovirus Typ 9-15 in 2 bis 8 Tage alten Hühnerfibroblasten(HF)-Kulturen, hergestellt von 6 Tage alten Embryonen, und in HF-Kulturen von 4- bis 18-tägigen Embryonen, nach 3 Tage Anlegen der Kultur, wurde untersucht. Die beiden Aktivitäten steigen sowohl mit dem Alter der HF-Kulturen wie auch mit dem Alter der zur Kulturherstellung verwendeten Hühnerembryonen an. Der Anstieg der interferierenden Aktivität des Virus in HF-Kulturen von älteren Embryonen ist größer als der der interferoninduzierenden Aktivität. Dieser Unterschied wurde jedoch nicht in HF-Kulturen von verschiedenem Alter beobachtet.

Ferner wurde festgestellt, daß in den obigen HF-Kulturen die Quantität der Interferonbildung sowie die Empfindlichkeit der HF-Kulturen gegenüber der antiviralen Wirkung von Interferon mit dem Alter der HF-Kulturen bzw. mit dem Alter der verwendeten Hühnerembryonen zunehmen, während die Empfindlichkeit der HF-Kulturen von Embryonen verschiedenen Alters gegenüber der Infektiosität von Vesiculärem Stomatitis-Virus (VSV-Titer) mit dem Alter der Hühnerembryonen abfällt. In HF-Kulturen verschiedenen Alters wurde jedoch eine VSV-Titerabnahme nur bei 2 bis 4 Tage alten HF-Kulturen nachgewiesen. Der Grad der VSV-Vermehrung in den verschiedenen Arten von HF-Kulturen zeigt keinen wesentlichen Unterschied.

Schrifttumsverzeichnis

Béládi,I. and Pusztai,R. : Interferon-like substance produced in chick fibroblast cells inoculated with human Adenoviruses. Z. Naturforschg. 22, 165-169 (1967)

Béládi,I., Bakay, M., Pusztai,R. and Hidasi,G. : Induction of interferon in chick cells by Adenoviruses of different origin. J. gen. Virol. 8, 143-144 (1970)

Brenner,S., Waterson,A.P. and Wildy,P. : The icosahedral form of an Adenovirus. J. mol. Biol. 1, 84-86 (1959)

Burke,D.C. and Isaacs,A. : Interferon: Relation to heterologous interference and lack of antigenicity. Acta virol. 4, 215-219 (1960)

Cantell,K., Valle,M., Schakir,R., Saukkonen,J.J. and Uroma,E. : Observations on production, assay and purification of chick embryo interferon. Ann. Med. exp. Fenn. 43, 125-131 (1965)

Carver,D.H. and Marcus, P.I. : Enhanced interferon production from chick embryo cells aged in vitro. Virol. 32, 247-257 (1967)

Cramblett,H.G., Kasel, J.A., Landmack,M. and Wilken, F.D. : Illnesses in children infected with an Adenovirus antigenically related to types 9 and 15. Pediatrics 25, 822 (1960)

Friedman, R. M. : Role of interferon in viral interference. Nature (Lond.) 201, 848-849 (1964)

Guenov,I. : Interference activity of animal Adenoviruses in chick embryo cell cultures. Acta virol. 14, 337-342 (1970)

Henle,W., Henle, G., Deinhardt,F. and Bergs, V.V. : Studies on persistent infections in tissue cultures. IV. Evidence for the production of an interferon in MCN cells by myxoviruses. J. exp. Med. 110, 525-541 (1959)

Henslová,E. and Libíková,H. : Optimal conditions for interferon formation in chick embryo cell cultures infected with tick-borne encephalitis virus. Acta virol. 10, 475-479 (1966)

Ho,M. and Enders,J.F. : Further studies on an inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures and its role in chronic viral infections. Virol. 9, 446-477 (1959)

Ho,M. and Köhler,K. : Studies on human Adenoviruses as inducers of interferon in chick cells. Arch. ges. Virusforsch. 22, 69-78 (1967)

Isaacs,A. and Baron,S. : Antiviral action of interferon in embryonic cells. The Lancet 1960, 946-947

Johnson,T.C. and McLaren,L.C. : Plaque development and induction of interferon synthesis by RMC poliovirus. J. Bact. 90, 565-570 (1965)

Kato,N. and Eggers,H. : A factor capable of enhancing interferon synthesis. Virol. 37, 545-553 (1969)

Markovits,P. : Interférence et production d'interféron dans des cellules de poulet infectées par les Adénovirus 4, 7, 8 et 18. Ann. Inst. Past. 118, 832 (1970)

Morahan,P.S. and Grossberg,S.E. : Age-related cellular Resistance of the chicken embryo to viral infections.
I. Interferon and natural resistance to Myxoviruses and Vesicular Stomatitis Virus.

II. Inducible resistance produced by influenza virus and Escherichia coli.
J. Infect. Dis. 121, 615-633 (1970)

Pusztai,R., Béládi,I., Bakay,M. and Musci,I. : Effect of ultraviolet irradiation and heating on the interferon-inducing capacity of human adenoviruses.
J. gen. Virol. 4, 169 (1969)

Reed,L. and Muench,H. : A simple method of estimating fifty per cent end-points.
American Journal of Hygiene 27, 493 (1938)

Shu,H.L. and Budiman,I. : Quantitative und qualitative Untersuchungen interferierender und Interferon-induzierender Aktivitäten von Adenoviren.
3. Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Mainz. (1970)

Valentine,R.C. and Pereira,H.G. : Antigens and structure of the adenovirus.
J. mol. Biol. 13, 13-20 (1965)

Vilcek,J. : Interference between tickborn encephalitis and Western equine encephalomyelitis viruses in chick embryo tissue cultures.
Acta virol. 4, 308-310 (1960)

Wigand,R. : Serologisch intermediäre Adenovirusstämme. Archiv ges. Virusforsch. 17, 611-618 (1965)

Wigand,R. : Serologische Beziehungen der Adenoviren der Gruppe II. Archiv ges. Virusforsch. 23, 40-47 (1968)

Wigand,R. and Fliedner,D. : Serologically Intermediate Adenovirus Strains; A Regular Feature of Group II Adenoviruses. Archiv ges. Virusforsch. 24, 245-256 (1968)

D A N K S A G U N G

Hiermit möchte ich Herrn Professor Dr. R. WIGAND für die Gewährung eines Arbeitsplatzes, Herrn Dr. med. H. L. SHU für die Überlassung des Themas und für die hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit verbindlichst danken.

Ebenso möchte ich Frau I. MAURER und Frl. D. KUNTZE für die mir erwiesene Hilfe danken.

L E B E N S L A U F

Am 20. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Herrn Kho Tai Lian und seiner Ehefrau Tan Jok Poo in Pekalongan, Indonesien geboren.

Nach sechsjähriger Volksschulausbildung besuchte ich sechs Jahre lang das Gymnasium in Djakarta, Indonesien, wo ich in 1959 das Abitur ablegte. Im Jahre 1960-1961 besuchte ich die technische Fakultät der Universität " Trisakti " in Djakarta. Danach studierte ich an der gleichen Universität Human-Medizin. Im Jahre 1966 kam ich nach Deutschland, um mein Medizinstudium an der Universität Homburg fortzusetzen.

Im Jahre 1970 legte ich das Staatsexamen ab, im Mai 1971 habe ich meine Medizinalassistentenzeit absolviert.